

PCT

14 FEB 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP2004/000067

08.1.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 月 1 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 0 3 9 4 1
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 0 3 9 4 1]

出 願 人 松下電器産業株式会社
Applicant(s):

REC'D 27 FEB 2004

WIPO

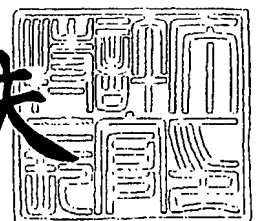
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 2 月 1 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 8 9 1 3

【書類名】 特許願

【整理番号】 2033740115

【提出日】 平成15年 1月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/535

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 中山 浩

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【選任した代理人】

【識別番号】 100062409

【弁理士】

【氏名又は名称】 安村 高明

【選任した代理人】

【識別番号】 100107489

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塩 竹志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001878

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0206122

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微粒子表面電荷制御剤を含む組成物、それを利用した微粒子分離方法および微粒子分離装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 微粒子表面の電荷を制御するための組成物であって、電荷制御剤を含み、該電荷制御剤の少なくとも 1 つの分子が微粒子に結合し、それによって該微粒子表面の電荷が改変される、組成物。

【請求項 2】 前記電荷制御剤の少なくとも 1 つの分子が、前記微粒子に特異的に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】 前記電荷制御剤の少なくとも 1 つの分子が、前記微粒子表面上に存在する、有機ポリマー、タンパク質、糖、脂質、および核酸からなる群から選択される生体機能性物質に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】 前記電荷制御剤の少なくとも 1 つの分子が、イオン結合または水素結合によって前記微粒子に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】 前記電荷制御剤が、カルボン酸基、スルホン酸基、フェノール基、およびアルコール基からなる群から選択される基を有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 6】 前記電荷制御剤が、3 級アミノ基または 4 級アミノ基をさらに有する、請求項 5 に記載の電荷制御材料。

【請求項 7】 前記電荷制御剤が、標識化抗体、標識化改変抗体、標識化ペプチド、標識化改変ペプチド、アプタマー、標識化アプタマー、および改変アプタマーからなる群からなる荷電物質から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】 前記電荷制御剤がマイナス電荷またはプラス電荷を有し、前記微粒子の表面に特異的に結合する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】 目的の微粒子を分離する方法であって、
目的の微粒子を含む試料を、微粒子表面の電荷を制御するための組成物であって、電荷制御剤を含み、該電荷制御剤の少なくとも 1 つの分子が微粒子に結合し、それによって該微粒子表面の電荷が改変される組成物と接触させる工程、および

得られた試料に電圧または電流を印加し、該目的の微粒子を前記電荷制御剤が結合した微粒子として分離する工程、を包含する、方法。

【請求項 10】 複数種の目的の微粒子を分離する請求項 9 に記載の方法であって、

前記接触させる工程が、該複数種の微粒子の各々の種について別個に独立して行われる、方法。

【請求項 11】 前記接触させる工程が、該複数種の微粒子の各々の種について互いに異なる電荷制御剤を含む組成物を用いて行われる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 目的の微粒子を分離する装置であって、

目的の微粒子を含む試料を、微粒子表面の電荷を制御するための組成物であって、電荷制御剤を含み、該電荷制御剤の少なくとも 1 つの分子が微粒子に結合し、それによって該微粒子表面の電荷が改変される組成物と接触させる手段、および

得られた試料に電圧または電流を印加し、該目的の微粒子を前記電荷制御剤が結合した微粒子として分離する手段、を包含する、装置。

【請求項 13】 複数種の微粒子を分離する請求項 12 に記載の装置であって、前記接触させる手段が、該複数種の微粒子の各々の種を含む試料を、前記組成物と別個に独立して接触させ得る、装置。

【請求項 14】 前記試料が血液であり、前記複数種の微粒子の各々の種および前記互いに異なる電荷制御剤が、それぞれ、白血球およびそれに特異的な抗体、リンパ球およびそれに特異的な抗体、血小板およびそれに特異的な抗体、ならびに赤血球およびそれに特異的な抗体である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】 前記試料が血液であり、前記複数種の微粒子が、白血球、リンパ球、血小板、および赤血球からなる群から選択される血球である、請求項 13 に記載の装置であって、

前記分離する手段により分離された血球を検出する検出手段、および該分離された血球を分取する手段をさらに備える、装置。

【請求項 16】 前記目的の微粒子が微生物細胞であり、そして前記電荷制

御剤が該微生物細胞に特異的な抗体である、請求項9に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微粒子の表面電荷を制御するための組成物、それを利用して微粒子を分離する方法、および微粒子分離装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

細胞、バクテリア、ウイルス、有機あるいは無機ポリマーなどの微粒子を分離するための方法として、イオン交換液体クロマトグラフィーおよび電気泳動を利用する方法が知られている。これらの方法は、測定対象物である上記それぞれの微粒子の表面電荷の差を利用して、固相との電氣的相互作用あるいは電気移動度によって分離する。例えば、キャピラリー電気泳動デバイスを利用してTリンパ細胞とBリンパ細胞を分離した報告（日本エム・イー学会雑誌、Vol. 15、No. 10（2001）、非特許文献1）があるが、それぞれの細胞は完全には分離されておらず、簡便かつ正確な微粒子分離技術が求められている。

【0003】

【非特許文献1】

日本エム・イー学会雑誌、Vol. 15、No. 10（2001）

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

上記の従来の技術を利用した場合、測定対象となる微粒子を、その表面電荷のみに依存して分離するため、夾雑物質との分離が不十分である場合が多く見られる。これは、異なった微粒子のそれぞれの表面を構成する物質の間に著しい差がなく、しかもそれら物質の有する電荷が比較的弱いいため、微粒子を電氣的に分離しようとしてもそれらの電気移動度に有意な差が生じないためである。

【0005】

【発明を解決するための手段】

本発明は、上記従来技術の課題を解決する手段を提供する。

【0006】

本発明は、微粒子表面の電荷を制御するための組成物に関し、この組成物は、電荷制御剤を含み、この電荷制御剤の少なくとも1つの分子は微粒子に結合し、それによって該微粒子表面の電荷が改変され得る。

【0007】

上記電荷制御剤の少なくとも1つの分子は、上記微粒子に特異的に結合し得る。

【0008】

上記電荷制御剤の少なくとも1つの分子は、上記微粒子表面上に存在する、有機ポリマー、タンパク質、糖、脂質、および核酸からなる群から選択される生体機能性物質に結合し得る。

【0009】

上記電荷制御剤の少なくとも1つの分子は、イオン結合または水素結合によって前記微粒子に結合し得る。

【0010】

上記電荷制御剤は、カルボン酸基、スルホン酸基、フェノール基、およびアルコール基からなる群から選択される基を有し得る。

【0011】

上記電荷制御剤は、3級アミノ基または4級アミノ基をさらに有し得る。

【0012】

上記電荷制御剤は、標識化抗体、標識化改変抗体、標識化ペプチド、標識化改変ペプチド、アプタマー、標識化アプタマー、および改変アプタマーからなる群からなる荷電物質から選択され得る。

【0013】

上記電荷制御剤はマイナス電荷またはプラス電荷を有し、上記微粒子の表面に特異的に結合し得る。

【0014】

本発明はまた、目的の微粒子を分離する方法に関し、この方法は、目的の微粒子を含む試料を、微粒子表面の電荷を制御するための組成物であって、電荷制御

剤を含み、この電荷制御剤の少なくとも1つの分子が微粒子に結合し、それによって上記微粒子表面の電荷が改変される組成物と接触させる工程、および得られた試料に電圧または電流を印加し、上記目的の微粒子を上記電荷制御剤が結合した微粒子として分離する工程を包含する。

【0015】

上記目的の微粒子は複数種であり得、上記接触させる工程は、上記複数種の微粒子の各々の種について別個に独立して行われ得る。

【0016】

上記接触させる工程は、上記複数種の微粒子の各々の種について互いに異なる電荷制御剤を含む組成物を用いて行われ得る。

【0017】

本発明はまた、目的の微粒子を分離する装置に関し、この装置は、目的の微粒子を含む試料を、微粒子表面の電荷を制御するための組成物であって、電荷制御剤を含み、この電荷制御剤の少なくとも1つの分子が微粒子に結合し、それによって上記微粒子表面の電荷が改変される組成物と接触させる手段、および得られた試料に電圧または電流を印加し、上記目的の微粒子を前記電荷制御剤が結合した微粒子として分離する手段を備える。

【0018】

上記目的の微粒子は複数種であり得、上記接触させる手段は、上記複数種の微粒子の各々の種を含む試料を、前記組成物と別個に独立して接触させ得る。

【0019】

上記方法において、上記試料は血液であり、上記複数種の微粒子の各々の種および上記互いに異なる電荷制御剤が、それぞれ、白血球およびそれに特異的な抗体、リンパ球およびそれに特異的な抗体、血小板およびそれに特異的な抗体、ならびに赤血球およびそれに特異的な抗体であり得る。

【0020】

上記装置において、上記試料は血液であり、上記複数種の微粒子は、白血球、リンパ球、血小板、および赤血球からなる群から選択される血球であり得、上記装置は、上記分離する手段により分離された血球を検出する検出手段、およびこ

の分離された血球を分取する手段をさらに備え得る。

【0021】

上記方法において、上記目的の微粒子は微生物細胞であり、そして上記電荷制御剤は上記微生物細胞に特異的な抗体であり得る。

【0022】

【発明実施の形態】

本発明は、微粒子表面の電荷を制御するための組成物に関し、この組成物は電荷制御剤を含み、この電荷制御剤の少なくとも1つの分子が微粒子に結合し、それによって上記微粒子表面の電荷が改変される。

【0023】

本発明の対象となる微粒子は、一般に、被検対象となる赤血球、白血球、血小板などの血液細胞、バクテリア、ウイルス、真菌などの微生物細胞を包含するがこれらに限定されるわけではなく、本発明は、試料中で微粒子形態にある任意の物質に適用可能である。

【0024】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

【0025】

図1に本発明の原理の概略を示す。一般に、固体（微粒子）と液体が相対運動をするとき、固体に密着して動く層（固定層）の最外面（滑り面）の電位と、液体内部の電位との差は、 ζ 電位または界面動電電位（electrokinetic potential）と呼ばれる。言い換えれば、 ζ 電位は、固体と液体との間に相対運動がおこるときの界面動電現象を支配する。

【0026】

図1の（a）は、電荷制御剤として標識抗体を用いた場合の例を模式的に示し、そして図1の（b）は、電荷制御剤としてアプタマーを用いた場合の例を模式的に示している。

【0027】

図1の（a）に示すように、被検対象である血球細胞などの微粒子（図1の（a）および（b）の左に丸で示される。血球細胞、微生物菌体などは一般に負に

荷電している)は、溶液中を移動するとき、その微粒子に固有の ζ 電位であると1を生じる。この微粒子に、免疫反応によって特異的に結合する抗体分子1を結合させると(図1の(a)の真ん中に示される)、この抗体・微粒子複合体もまた、溶液中を移動するとき、 ζ 電位 ζ_2 を生じる。通常、抗体分子1は有意な有効電荷をもっていないので、 ζ_2 は ζ_1 とほぼ等しくなる。ここで、抗体分子1が電荷を有する標識物質2を有している場合(図1(a)に示す例ではマイナス電荷をもっている)、標識抗体・微粒子複合体が溶液中を移動するとき生じる ζ 電位 ζ_3 は、標識物質2のマイナス電荷に起因して ζ_1 より小さくなる(例えば、 $\zeta_1 = -10 \text{ mV}$ のとき、 $\zeta_2 = -11 \text{ mV}$ 、そして $\zeta_3 = -20 \text{ mV}$ など)。これによって、電気泳動や電気浸透のような動電現象における微粒子の挙動が増大され得る。被検対象が正に荷電している微粒子である場合であっても、プラス電荷を有する標識物質を用いて微粒子の挙動を改変し得る。

【0028】

被検対象である微粒子に特異的に結合する抗体は、当該分野で公知の方法によって調製され得るか、または市販の抗体を利用し得る。このような抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、抗体フラグメント、一本鎖抗体、キメラ抗体であり得る。このような抗体は、微粒子上の有機ポリマー、タンパク質、糖、脂質、および核酸からなる群から選択される生体機能性物質のエピトープを特異的に認識し得、そしてそれに結合し得る。このような抗体は、例えば、被検対象である微粒子に対して少なくとも約 10^7 、 10^8 、 10^9 または 10^{10} M^{-1} の特異的結合親和性を示し得る。

【0029】

このような抗体は、当該分野で公知の方法によって調製され得る。すなわち、ヤギ、ヒツジ、ウシ、モルモット、ウサギ、ラット、マウスのような宿主を、微粒子またはその一部分を用い、肉趾、筋肉内、皮内、リンパ節周辺または腹腔内に投与し、アフィニティー精製を含む慣用的な方法によって、宿主中で産生された免疫グロブリンを沈殿、単離、および精製して得ることができる。

【0030】

あるいは、このような抗体は、KoehlerおよびMilstein (Na

ture 256:495、1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosborら、1983、Immunol. Today 4 72; Coteら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80:2026)、およびEBVハイブリドーマ技術(Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R Liss Inc.、New York、NY、77-96頁、1985)などを含む公知技術を用い、モノクローナル抗体として得ることができる。モノクローナル抗体を得るための具体的な手順は、例えば、Godingら、MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (第2版) Acad. Press、N. Y. などに記載されている。

【0031】

抗体に結合し、マイナス電荷またはプラス電荷を有する上記標識物質の例として、例えば、色素標識、金コロイド、ラテックスなどが挙げられる。多くの色素標識が市販されている。具体的には、以下に示す、カスケードブルー(登録商標)誘導体、FM(登録商標)3-25などが挙げられる。このような標識物質で上記の抗体を標識する技術は当該分野で公知である。市販されている色素標識を用いる場合、通常、製造業者の指示書に従って色素標識を抗体に結合する。これらの標識物質は、代表的には、有機ポリマー、タンパク質、糖、脂質、核酸などの生体機能性物質に、イオン結合、疎水結合、水素結合、またはそれらの組み合わせによって結合される。

【0032】

図1の(b)は、電荷制御物質としてマイナス電荷をもつアプタマーを用いた場合を模式的に示す。図示されるように、アプタマー分子は直接微粒子に結合し、それによって、微粒子・アプタマー複合体のもつ電位 ζ 3が、微粒子単独の場合の ζ 電位 ζ 1より小さくなる。このため、上記図1の(a)に示されるのと同様に、電気泳動や電気浸透のような動電現象における微粒子の挙動が増大され得る。被検対象が正に荷電している微粒子である場合であっても、プラス電荷を有するアプタマーを用いて同様に微粒子の挙動を改変し得る。

【0033】

なお、本明細書で用いる用語「アプタマー」は、当該分野で用いられる通常の意味で用いられ、細胞内でDNAと結合し、標的とするタンパク質の働きを抑える物質を指し、2本鎖DNAや1本鎖RNAでこの性質をもつ物質が知られている。

【0034】

アプタマーは、一般に、以下の手順で得られ得る。

【0035】

まず、ランダムにオリゴDNA（60塩基）を合成する。理論的に10兆種類以上あるオリゴDNAのプールから、次に目的のタンパク質と結合するオリゴDNAをアフィニティー・カラムで分離する。分離したオリゴDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で増幅し、再び、アフィニティー・カラムで分離することを繰り返す。この操作を5回以上繰り返すことによって、目的のタンパク質に親和性の強いアプタマーを選抜し得る。あるいは、必要に応じて、市販のアプタマーを利用し得る。例えば、Molecular Probe社製などからアプタマーが市販されている。一般に、これらのアプタマーは、溶液または粉末の形態で市販されている。

【0036】

以下、実施例を用いて本発明を説明する。これらの実施例は、本発明の例示であって本発明を制限するものではない。

【0037】

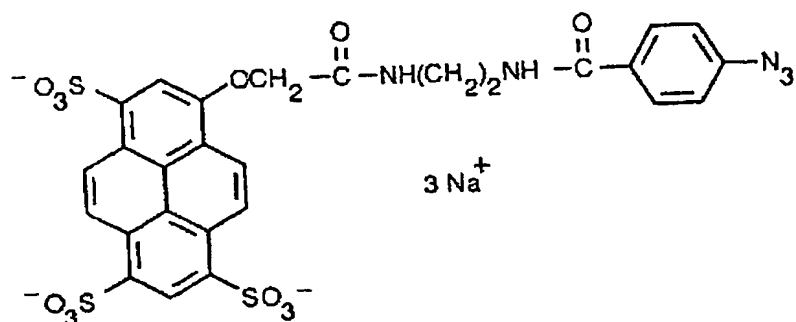
【実施例】

（実施例1）血液細胞の分離

ヘルパーT細胞特有に発現するCD4（cluster of differentiation 4）に対する抗体と、キラーT細胞特有に発現するCD8に対する抗体に、以下の手順に従って、式1で示されるカスケードブルー（登録商標）誘導体（Molecular Probe社製：アミノエチル4-アジドベンズアミド三ナトリウム塩： $C_{27}H_{18}N_5Na_3O_{12}S_3$ ：以下、単にカスケードブルー誘導体と記す）を結合した。

【0038】

【式1】



なお、式1に示されるように、カスケードブルー誘導体は、スルホン酸基を有している。

【0039】

シグマ社から入手した抗CD4抗体（1mg/ml、pH7.0のリン酸緩衝液（PBS）中）と、抗体量に対して10倍モル量のカスケードブルー誘導体（5.1μg/ml、pH7.0のPBS中）を添加し、室温で3時間放置することによりカスケードブルー誘導体を抗CD4抗体に結合させた。次いで、得られた反応液を、ゲルろ過（Sephadex G-25）に供することにより、未結合カスケードブルー誘導体を除去した。その結果、抗CD4抗体分子あたり2個のカスケードブルー誘導体が結合した抗CD4抗体が得られた。

【0040】

同様に、シグマ社から入手した抗CD8抗体を処理し、抗CD8抗体分子あたり8個のカスケードブルー誘導体が結合した抗CD8抗体が得られた。

【0041】

なお、カスケードブルー誘導体が抗体に結合した数は、以下の式から算出した。

【0042】

カスケードブルー誘導体の抗体への結合数＝

$$[C b 4 1 0 n m] / ([A b - C b 2 8 0 n m] - \alpha \times [4 1 0 n m])$$

ここで、

[A b 2 8 0 n m] : 抗体の 2 8 0 n m における吸光度、

[C b 2 8 0 n m] : カスケードブルー誘導体の 2 8 0 n m における吸光度、

[C b 4 1 0 n m] : カスケードブルー誘導体の 4 1 0 n m における吸光度、

[A b - C b 2 8 0 n m] : カスケードブルー誘導体標識化抗体の 2 8 0 n m における吸光度、

$\alpha = [C b 2 8 0 n m] / [C b 4 1 0 n m]$ である。

【0043】

これらのカスケードブルー誘導体で標識した抗体を、以下に詳細に示す手順に従って、血液から得られたT細胞を含む試料とインキュベート（25℃、1時間）した後、その混合液をキャピラリー電気泳動装置（ベックマン社製、P／ACE システム MDQ）に導入した。その結果、図2に示すようにヘルパーT細胞とキラーT細胞とを分離することができた。なお、図2は、電気泳動後のキャピラリーについて、波長410nmの光で励起し、カスケードブルー誘導体由来する波長430nmの蛍光の強度をスキャンした結果を示したものである。

【0044】

電荷制御剤と血液細胞との接触および血液細胞の分離

CD4を発現した細胞を含む溶液500 μ lおよびCDを発現した細胞を含む溶液500 μ lを1.5ml容量のサンプルチューブにとり、カスケードブルー標識抗CD4抗体溶液（1mg/ml）およびカスケードブルー標識抗CD8抗体溶液（1mg/ml）5 μ lを加え、室温、暗所で3時間放置した後、以下の条件下で蛍光キャピラリー電気泳動を行った。

【0045】

<キャピラリー電気泳動および検出条件>

装置 : P／ACE system MDQ (Beckman Coulter)

キャピラリー: ヒューズドシリカ管 (Beckman社製) 内径100 μ m、

総長 32.0 cm、有効長 21 cm

泳動条件 : 10 kV、20 分

泳動緩衝液 : トリス 10.8 g、ホウ酸 5.5 g、0.5 M EDTA (pH 8) 4 ml、アルギン酸ナトリウム 0.1 g 塩化ナトリウム 2 g を水に溶解して 1000 ml に調整

検出条件 : 励起波長 410 nm、蛍光波長 430 nm

検出器 : MDQ レーザ誘導蛍光 (LIF) デテクター

その結果、それぞれのピークは、BacLight SYTO9 (Molecular Probe 社製) を入れたときと同じ移動度で検出され、これらピーク画分を収集し、蛍光顕微鏡により観察したところ、蛍光を発するそれぞれの細胞が確認できた。これにより、カスケードブルー標識抗 CD4 抗体およびカスケードブルー標識抗 CD8 抗体が、CD4 細胞および CD8 細胞とそれぞれ特異的に結合して検出されたことが判明した。なお、100 mM トリス-ホウ酸緩衝液にカスケードブルー標識抗 CD4 抗体溶液、カスケードブルー標識抗 CD8 抗体溶液だけを入れたコントロール標品は、電気浸透流とほぼ同じ保持時間にピークが検出され、他のピークは観察されなかった。

【0046】

(実施例 2) バクテリアの分離

実施例 1 と同様にして、サルモネラ チフィリミウム (*S. typhimurium*、以下 S. T. と記す) に対する抗体 (定法に従って調製) と、サルモネラ エンテリティディス (*S. enteritidis*、以下 S. E. と記す) (定法に従って調製) に対する抗体とに、カスケードブルー誘導体を結合させた。その結果、1 分子あたり 1.5 個のカスケードブルー誘導体が結合した抗 S T 抗体、および 1 分子あたり 9 個のカスケードブルー誘導体が結合した抗 S E 抗体が得られた。

【0047】

これらのカスケードブルー誘導体で標識した抗体を、以下に詳細に示す手順に従って、サルモネラ菌を含む試料とインキュベート (37℃、30 分間) した後、得られた混合液をキャピラリー電気泳動装置 (ベックマン社製、P/ACE

システム MDQ) に導入した。その結果、図 3 に示すようにそれぞれのサルモネラ菌を分離することができた。なお、図 3 もまた、電気泳動後のキャピラリーについて、波長 410 nm の光で励起し、カスケードブルー誘導体由来する波長 430 nm の蛍光の強度をスキャンした結果を示したものである。

電荷制御剤とサルモネラ菌との接触およびサルモネラ菌の分離

S. T. の斜面固体培養物から、菌体を 1 白金耳とり、常法に従って調製した EEM ブイヨン培地 (Enterbacteriaceae Enrichment Mannitol (EEM) ブイヨン培地: 4.35 g/100 ml) 50 ml を含む 200 ml 容の三角フラスコに別個に接種し、37℃で16時間振盪培養した。同様に、S. E. についてもその培養液を調製した。得られた培養液の各 500 μ l を、1.5 ml 容量のサンプルチューブにとり、カスケードブルー標識抗 S T 抗体溶液 (1 mg/ml) およびカスケードブルー標識抗 S E 抗体溶液 (1 mg/ml) を各 5 μ l 加え、37℃で30分間暗所に放置してサルモネラ菌と各サルモネラ菌に対する標識化抗体とを接触させた。次いで以下の条件下で蛍光キャピラリー電気泳動を行った。

<キャピラリー電気泳動および検出条件>

装置 : P/ACE system MDQ (Beckman Coulter)

キャピラリー: ヒューズドシリカ管 (Beckman 社製) 内径 75 μ m、総長 31.2 cm、有効長 21 cm

泳動条件 : 10 kV、20 分

泳動緩衝液 : トリス 10.8 g、ホウ酸 5.5 g、0.5 M EDTA (pH 8) 4 ml、アルギン酸ナトリウム 0.1 g および塩化ナトリウム 2 g を水に溶解して 1000 ml に調整

検出条件 : 励起波長 410 nm、蛍光波長 430 nm

検出器 : MDQ レーザ誘導蛍光 (LIF) デテクター

また、100 mM トリス-ホウ酸緩衝液 500 μ l に、上記の 2 つのカスケードブルー標識抗サルモネラ抗体のいずれかを含む溶液 5 μ l を添加したもの (コントロール標品)、ならびに *Brucella* sp. strain KYM-

1、*Stenotrophomonas* sp. strain KYM2、*Acinetobacter* sp. strain KYM3、*Comamonas* sp. strain KYM4、*Aureobacterium* sp. strain KYM6、*Cellulomonas* sp. strain KYM7、*Acinetobacterium* sp. strain KYM8、3種の*Escherichia coli*の合計10種類のバクテリアをそれぞれ 10^5 個/mlとなるように100mMトリスーホウ酸緩衝液500 μ lに溶解し、上記2つのカスケードブルー標識抗サルモネラ抗体のいずれかを含む溶液5 μ lを加え、室温で15分間暗所に放置したもの（比較標品）についても同様にして蛍光キャピラリー電気泳動を行った。その結果、トリスーホウ酸緩衝液中にカスケードブルー標識抗サルモネラ抗体だけを含むコントロール標品は、電気浸透流とはほぼ同じ保持時間に、フリーのカスケードブルー標識抗サルモネラ抗体のピークが検出され、他のピークは観察されなかった。同様に、10種類のバクテリアを含む溶液（比較標品）についても、コントロールと同様にフリーのカスケードブルー標識抗サルモネラ抗体のピークのみが検出された。

【0048】

これに対し、サルモネラ菌を含む試料においては、フリーのカスケードブルー標識抗サルモネラ抗体に相当するピークのほかに、*BacLight SYTO 9*を入れたときと同じ移動度にピークが検出され、このピーク画分を収集し蛍光顕微鏡により観察したところ、蛍光を発する各サルモネラ菌が確認できた。これにより、カスケードブルー標識抗サルモネラ抗体の各々が、各サルモネラ菌とそれぞれ特異的に結合して検出されたことが判明した。

【0049】

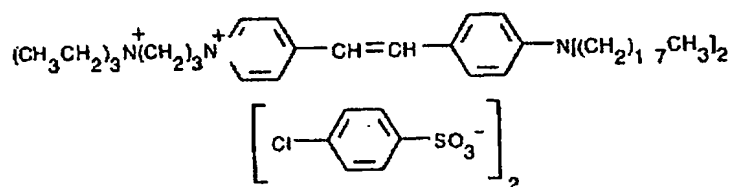
（実施例3）

カスケードブルー誘導体の代わりに、プラス電荷を有する、以下の式2に示すFM（登録商標）3-25：N-（3-トリエチルアンモニウムプロピル）-4-（4-（ジオクタデシルアミノ）スチリル）ピリジニウムジ-4-クロロベンゼンスルホネート（ $C_{68}H_{113}Cl_2N_3O_6S_2$ ）を用いたことを除いて、実施例1と同様に、ヘルパーT細胞とキラーT細胞とを分離した。電気泳動後

のキャピラリーについて、波長 510 nm の光で励起し、上記に由来する波長 624 nm の蛍光強度をスキャンすることにより、ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞とを分離して検出することができた。

【0050】

【式 2】



(実施例 4)

図 4 に概略を示した構成の微粒子分離装置を用いて実施例 1 と同様に血球を分離した。ここで、図 4 に電荷制御剤 1 で示される槽には、2 個のカスケードブルー誘導体が結合した CD4 抗体を入れ、図 4 に電荷制御剤 2 で示される槽には、10 個のカスケードブルー誘導体が結合した CD8 抗体を入れ、図 4 に電荷制御剤 3 で示される槽には、20 個のカスケードブルー誘導体が結合した CD45 抗体を入れ、そしてそして図 4 のサンプルで示される槽には、血球サンプルを入れた。図に示すすべてのポンプを作動させ、これらポンプに連結されるミキサーでそれぞれの標識化抗体を混合した後、キャピラリー電気泳動装置に導入した。電気泳動後のキャピラリーについて、波長 410 nm の光で励起し、上記化合物に由来する波長 430 nm の蛍光強度をスキャンすることにより、ヘルパー T 細胞とキラー T 細胞とを分離して検出することができた。

【0051】

【発明の効果】

簡便かつ正確な微粒子分離技術が提供される。表面電荷制御剤を使用すること

によって微粒子表面電荷の効率よい制御を可能にし、微粒子の正確かつ簡便な分離および測定を実現し得る。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の原理の概略を示す図。

【図 2】

本発明によるヘルパー T 細胞とキラー T 細胞との分離を示すクロマトグラム。

【図 3】

本発明によるバクテリア細胞の分離を示すクロマトグラム。

【図 4】

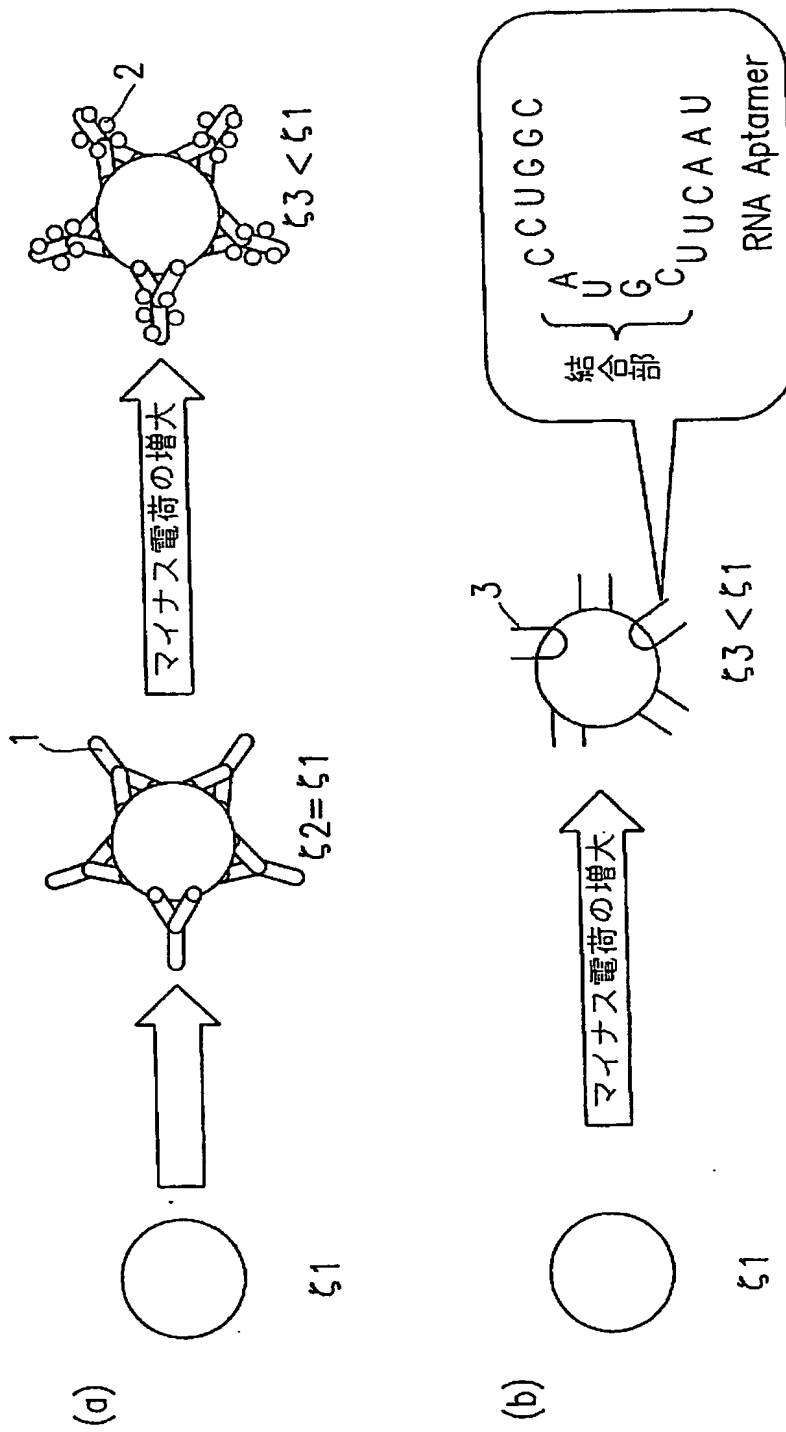
本発明による微粒子分離装置の概略を示す図。

【符号の説明】

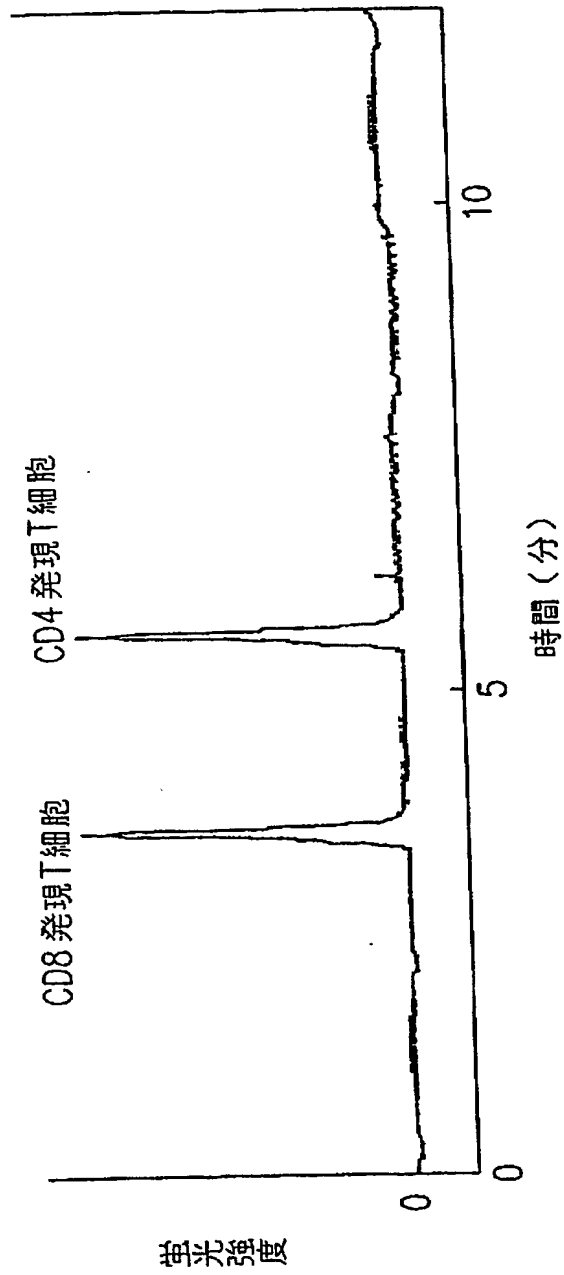
1. 抗体
2. 標識物質
3. アプタマー

【書類名】 図面

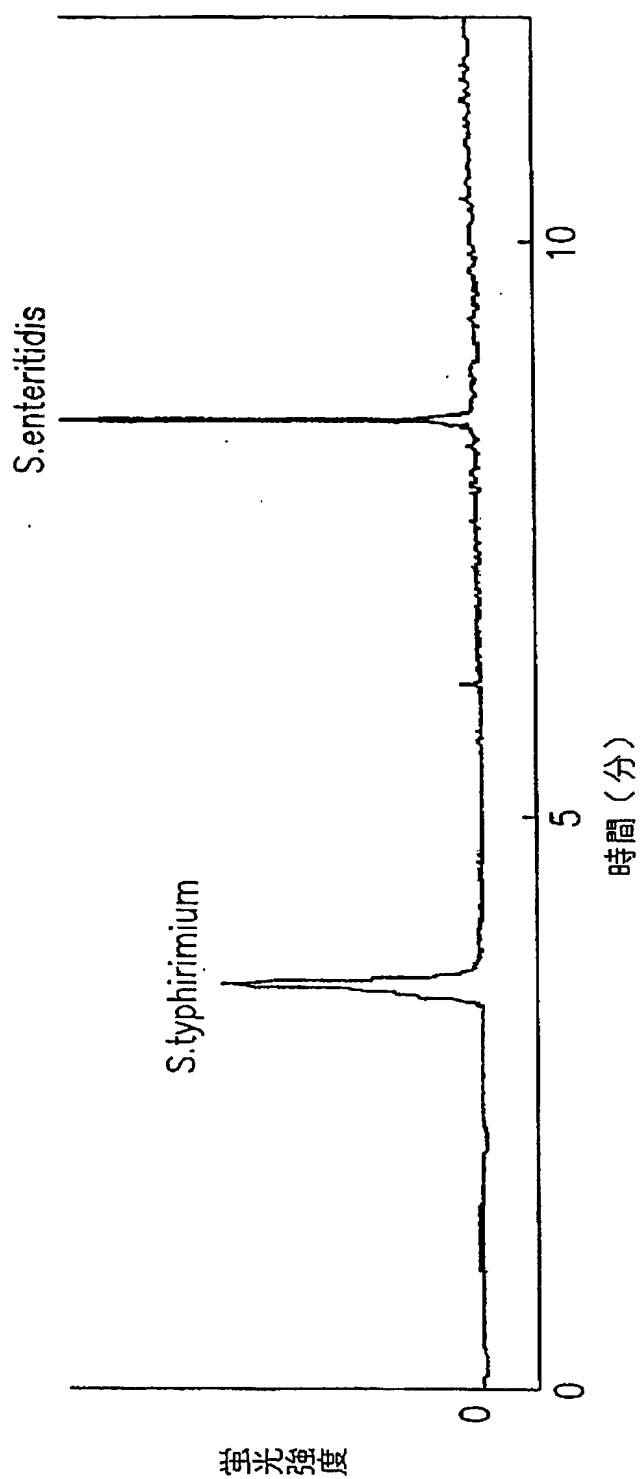
【図 1】



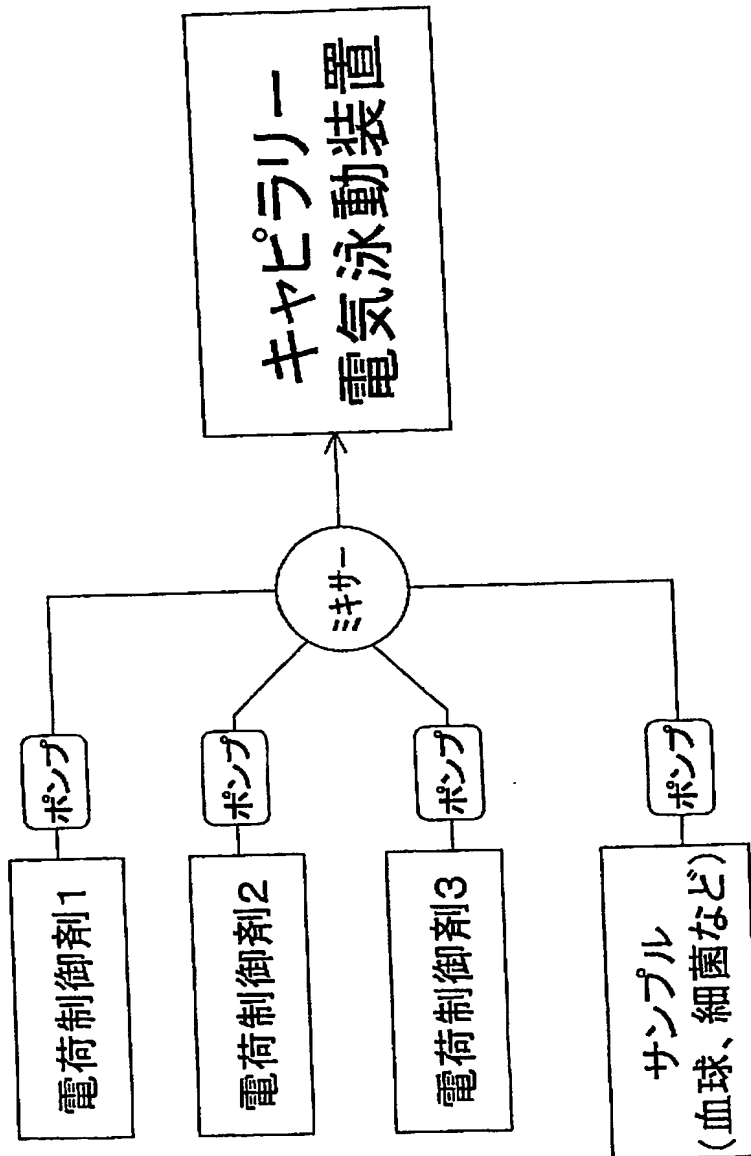
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡便かつ正確な微粒子分離技術を提供する。

【解決手段】 微粒子表面の電荷を制御するための組成物を提供する。この組成物は、電荷制御剤を含み、この電荷制御剤の少なくとも1つの分子が微粒子に結合し、それによって上記微粒子表面の電荷が改変される。上記電荷制御剤は、抗体、標識化抗体、アプタマー、標識化アプタマーを包含し得る。目的の微粒子を分離する方法もまた提供される。この方法は、目的の微粒子を含む試料を、上記の組成物と接触させる工程、および得られた試料に電圧または電流を印加し、該目的の微粒子を前記電荷制御剤が結合した微粒子として分離する工程を包含する。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-003941
受付番号	50300030036
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成15年 1月14日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000005821
【住所又は居所】	大阪府門真市大字門真1006番地
【氏名又は名称】	松下電器産業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100078282
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見1丁目2番27号 クリスタル タワー15階
【氏名又は名称】	山本 秀策

【選任した代理人】

【識別番号】	100062409
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見1丁目2番27号 クリ スタルタワー15階 山本秀策特許事務所
【氏名又は名称】	安村 高明

【選任した代理人】

【識別番号】	100107489
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号 クリスタル タワー15階 山本秀策特許事務所
【氏名又は名称】	大塩 竹志

次頁無

特願 2 0 0 3 - 0 0 3 9 4 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 5 8 2 1]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

氏 名 松下電器産業株式会社